

## **JP4340453**

Publication Title:

**BIOSENSOR AND SEPARATION AND QUANTIFICATION METHOD USING THE SAME**

Abstract:

Abstract of JP 4340453

(A) **PURPOSE:**To simply and economically exclude the electrochemical or chemical obstructing action due to the reductive substance present in a sample by arranging a substance containing a physiologically active substance to the region separated from an electrode. **CONSTITUTION:**A spacer 3 having a sample receiving space 3' and a lid 4 are bonded to the electrode 2 formed on a substrate 1 and a substance containing a physiologically active substance is arranged to the region 6 separated from the electrode 2. The sample is introduced into the space 3' from an opening 7 to be measured. First measurement is performed at the beginning of the supply of the sample and second measurement is performed after the elapse of a sufficient time.; The first measured value is a value before the product from the objective substance reacted with the physiologically active substance reaches the electrode and the density of the obstructing substance coexisting in the sample is quantified from said value. The second measured value is the value due to both of them and the concn. of the sum of the objective substance and the obstructing substance is quantified from said value. Therefore, by subtracting the former from the latter, the concn. of the objective substance is calculated.

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-340453

(43) 公開日 平成4年(1992)11月26日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327 27/416		7235-2 J 7235-2 J 7235-2 J	G 0 1 N 27/30 G 0 1 N 27/30	3 5 1 3 5 3 R 3 5 3 A
審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-113030

(22) 出願日 平成3年(1991)5月17日

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 上野山 晴三

大阪府高槻市塚原六丁目7番4号

(72) 発明者 奥田 久

京都府宇治市小倉町新田島20番地14号

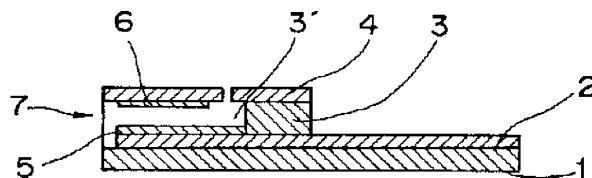
(74) 代理人 弁理士 柴田 康夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサーおよびそれを用いた分離定量方法

(57) 【要約】

【構成】 液体試料中の特定物質と生理活性物質とを反応させ、反応に関与する物質を電気化学的に検出するバイオセンサーであり、生理活性物質を含む物質が電気化学的検出手段である電極から離れた部位に固相として配置されている。

【効果】 試料中に存在するアスコルビン酸や尿酸などの還元性物質による電気化学的または化学的妨害作用を簡単かつ経済的に排除して反応に関与した物質を電気化学的に定量できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体試料中の特定物質と生理活性物質またはそれに関与する物質とを反応させ、反応に関与する物質を電気化学的に検出するバイオセンサーにおいて、生理活性物質を含む物質を電気化学的検出手段である電極から離れた部位に配置したことを特徴とするバイオセンサー。

【請求項2】 生理活性物質またはそれに関与する物質および少なくともメディエータを電気化学的検出手段である電極から離れた部位に配置した請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項3】 電極上にメディエータを配置した請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項4】 配置した生理活性物質またはそれに関与する物質、あるいは少なくともメディエータが共存配置された生理活性物質またはそれに関与する物質と液体試料が接する部位を高分子物質層で被覆した請求項1～3のいずれかに記載のバイオセンサー。

【請求項5】 生理活性物質が酵素である請求項1～4のいずれかに記載のバイオセンサー。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載のバイオセンサーに試料供給後、供給された試料について少なくとも2回、すなわち、生理活性物質に関与しないが試料中に共存する電気化学的活性物質に関与する試料供給当初の電気化学信号、並びに生理活性物質および試料中に共存する電気化学的活性物質の両者に関与する試料供給後十分な時間経過後の電気化学信号を取り込み、両信号を演算することにより、生理活性物質と特異的に反応する物質、並びに試料中に共存する電気化学的活性物質を分離定量することを特徴とする分離定量方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、バイオセンサーおよびそれを用いた分離定量方法に関し、更に詳しくは液体試料中の特定物質と酵素等の生理活性物質とを反応させ、反応に関与する物質を電気化学的に検出するバイオセンサーおよび物質の分離定量方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】電気化学的検出手段によるバイオセンサーを使用して血液等の液体生体試料を測定する際、試料中に共存するアスコルビン酸、尿酸等の還元性物質が電気化学的あるいは化学的に与える妨害作用が常に問題となっている。特許および文献上見られる、妨害作用除去あるいは回避策は極めて多数である。それらを分類すると、以下の通りである：

(1)妨害除去膜法(たとえば、米国特許第3,979,274号、同第4,240,889号、特開昭57-211542号公報、特開昭58-5643号公報など)

(2)電極酸化法(たとえば、米国特許第4,431,507号、特開昭57-118152号公報、特開昭57-

211054号公報、特開昭58-5642号公報、特開昭58-85148号公報、特開昭58-85149号公報、特開昭58-146847号公報、ジ・イレブンス・ケミカル・センサー・シンポジウム(The 11th Chemical Sensor Symposium),大川ら、24、「フロー型電気化学バイオセンサシステムに対する電気活性妨害物質の電気化学的オンライン除去」など)

(3)複数作用電極法(たとえば、米国特許第3,539,455号、特開昭58-146847号公報、特開平1-253648号公報、ミヤハラら、センサー・アンド・アクチュエーターズ(Sensor and Actuators),第7巻1頁(1985)など)

(4)妨害物質酸化酵素添加法(特公昭58-17427号)

(5)ダブル・ポテンシャル・ステップ法(たとえば、日本化学会第58回春季年会、4IG06、松浦ら「微小カーボンファイバー電極による過酸化水素の測定」)

【0003】しかし、これら従来技術はそれぞれ以下のような欠点を有する。

## 20 (1)妨害除去膜法

電気化学的検出手段である電極を選択透過性の膜で被覆し、測定対象物質は透過させ、妨害作用を有する共存物質は阻止しようとする方法である。酸素分子、過酸化水素のような極低分子を電気化学反応物質とする場合にはこの方法を使えるが、フェリシアン化カリ、フェロセン等のメディエータ(電荷仲介媒体)の場合は、妨害作用を有する共存物質とメディエータとの分子サイズ上の区別は不可能となりこの方法は使用できない。また、この方法は、妨害除去膜の外部(試料液中)で起り得る共存物質と電気化学反応物質との酸化還元反応に対する対策とはならない。さらに、膜による感度および応答性の劣化があり、それが膜厚により左右されるため、センサーの個体差が拡大される。

## 【0004】(2)電極酸化法

この方法では、目的物質を測定するための電極系(測定電極系)の他に、試料中に共存する妨害物質を陽極酸化するための電極系(電解電極系)を使用する。試料が供給されると、妨害物質が酵素反応系や測定電極系に達する前に、それを電解電極系により陽極酸化する方法である。

【0005】この方法では測定電極系の他に電解電極系が本質的に必要であり、それらおよび酵素等生理活性物質の反応系を空間的に分離するため、構造が複雑となる。妨害物質電解効率を向上させるには、電解電極系の表面積を大きくする、試料液を強制的に攪拌する、流動させるなど種々の工夫がなされているが、いずれもセンサー構造を複雑に大きく、応答性を低下させてしまう。ことに使い捨て使用を目的としたセンサーへの応用が困難となる。

50 【0006】また、妨害物質電解効率の向上と測定時間

の短縮・応答性の向上とは相反する要求である。両者を満足するための極めて薄い一体化多孔質電極系が提案されているが、構造的に弱く、不安定であるので、構造的強化が必要であり、単純で安価なセンサーの実現は困難である。

【0007】測定系全系を含めると、測定電極系の他に、電解電極系を有するので、電気回路や測定用ソフトウェアも複雑で高価となることは避けられない。

#### 【0008】(3)複数作用電極法

この方法では、測定電極系の他に、試料中に共存する妨害物質を測定するための電極系(妨害物質測定系)を使用する。試料が供給されると、測定電極系は目的物質と妨害物質の両者を測定し、妨害物質測定系は妨害物質のみを測定する。両測定値の差をとることにより目的物質の濃度を測定する方法である。

【0009】この方法では、測定電極系の他に妨害物質測定系が本質的に必要である。測定電極系で生成された反応生成物が妨害物質測定系へ影響を及ぼす危険性があり、十分な空間的分離が必要である。従って、それだけセンサーのサイズが大きく、複雑化する。また、電極系が2系統以上あるので、電流増幅用電気回路も2系統以上必要となる。

【0010】さらに、目的物質測定系および妨害物質測定系の妨害物質に対する測定感度を釣り合わせる必要があるが、実際問題として、これが非常に困難である。くり返し使用のセンサーでは両電極の妨害物質の測定感度を校正する方法も考えられるが、一回使い捨てセンサーでは不可能である。

#### 【0011】(4)妨害物質酸化酵素添加法

妨害物質が電極反応あるいは測定対象物質との酸化還元反応を行う前に、アスコルビン酸、尿酸等の妨害物質を各々の酸化酵素により酸化しておく方法である。この方法では妨害物質を除去するために特異性の高い酵素を使用するため、複数の妨害物質が存在する場合にはそれぞれに対応した複数の酵素を共存させる必要があり、バイオセンサーのコストアップになる。また、妨害物質の前酸化が必要条件であり、妨害物質酸化生成物が目的物質の測定を妨害しない工夫も必要となるので構造的に複雑になるのは避けられない。さらに、妨害物質は酸化により、測定にはかかってこないように「除去」されてしまう。これは測定すれば有効な情報を捨てることになる。

#### 【0012】(5)ダブル・ポテンシャル・ステップ法

測定電極の測定対象物質に対する自然電位( $E_{02}$ とする)と、共存する妨害物質の自然電位( $E_{01}$ とする)が異なる場合( $E_{01} < E_{02}$ とする)、 $E_{01} < E_1 < E_{02}$ を満足する電位 $E_1$ で妨害物質濃度を測定し、 $E_{02} < E_2$ を満足する電位 $E_2$ で測定対象物質および妨害物質の両者の和を測定し、その差を求めて、目的物質の濃度を測定する方法である。

【0013】この方法はその原理から、測定対象物質に

対する自然電位( $E_{02}$ )と妨害物質の自然電位( $E_{01}$ )が十分離れていなければ、分離測定することが不可能となる。測定対象物質が過酸化水素の場合、この関係は保たれることが多いが、電極材質やその表面状態によっては、 $E_{01}$ と $E_{02}$ は接近することや、逆転することも観察されている。

【0014】バイオセンサーの安定化や直線領域の拡大を目的として、メディエータが使われることが多いが、この場合は、測定対象物質も妨害物質もメディエータを介して電極と電荷の受授を行なうので、 $E_{01} = E_{02}$ となり、ダブル・ポテンシャル・ステップ法は使用できない。

#### 【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、液体試料を分離することなく、測定対象物質の信号を妨害物質の信号から、簡単に安価に分離することのできるバイオセンサーおよび分離定量方法を提供しようとするものである。

【0016】前述の通り従来法では、妨害除去膜法やダブル・ポテンシャル・ステップ法はメディエータを使用したバイオセンサー系では適用できない。また、妨害除去膜法や電極酸化法は、測定感度や応答速度を犠牲にせざるを得ない。さらに、電極酸化法や複数作用電極法は、バイオセンサーの構造が複雑になり、従って電気回路系や測定系も複雑・高価になる。本発明は、これらの問題を解決しようとするものである。

#### 【0017】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、上記課題は、液体試料中の特定物質と生理活性物質またはそれに関与する物質(以下、まとめて「生理活性物質」という。)とを反応させ、反応に関与する物質を電気化学的に検出するバイオセンサーにおいて、生理活性物質および要すればメディエータを電気化学的検出手段である電極から離れた部位に配置し、要すれば配置された生理活性物質またはメディエータを高分子物質層により被覆したバイオセンサー、および上記バイオセンサーに試料供給後、供給された試料について少なくとも2回、すなわち、生理活性物質に関与しないが試料中に共存する電気化学的活性物質に関与する試料供給当初の電気化学信号、並びに生理活性物質および試料中に共存する電気化学的活性物質の両者に関与する試料供給後十分な時間経過後の電気化学信号を取り込み、両信号を演算することにより、生理活性物質と特異的に反応する物質、並びに試料中に共存する電気化学的活性物質を分離定量することの特徴とする分離定量方法により解決される。

【0018】本発明において生理活性物質には、次のようなものが包含される:

(1)酸化還元酵素の基質(たとえば、乳酸、ブドウ糖、尿酸、ピルビン酸、コレステロールなど)

(2)酸化還元酵素(たとえば、乳酸脱水素酵素、イソク

エン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素など)

(3) 基質または酵素の反応を利用して最終的に酸化還元反応を行う物質(たとえば、トリグリセリド、リン脂質、GOT、GPT、CPKなど)

(4) 抗原抗体反応を活用して測定する物質(たとえば、各種免疫グロブリン、 $T_3$ 、 $T_4$ などの各種ホルモン)

【0019】本発明において、生理活性物質を「配置」とは、所定の箇所に生理活性物質を、試料中の特定物質と反応可能な状態で存在させておくことを意味し、メディエータを「配置」とは、所定の箇所にメディエータを、試料に溶解可能な状態で存在させておくことを意味し、その状態は限定されない。たとえば、生理活性物質を溶液の形で所定箇所に塗布し、乾燥して、生理活性物質を乾燥残渣として配置することができる。あるいは、適当な含浸用基材(たとえば、濾紙、布片など)に生理活性物質の溶液を含浸させ、乾燥して作成した、生理活性物質を含む基材を所定箇所に固定してもよい。また、生理活性物質のあるものは、グルタルアルデヒドやジサクシニミジルスベレート等の架橋剤で固定してもよい、あるいは基材と生理活性物質間の吸着力を利用して吸着させてもよい。

【0020】メディエータを使用するバイオセンサーでは、測定電極上には必要に応じてメディエータを配置し、酵素等の生理活性物質は配置しない。親水性高分子等をメディエータと混合し、配置してもよい。

【0021】一方、酵素等の生理活性物質は少なくともメディエータと共に測定電極から十分離れた位置に配置する。その位置は、試料供給後、測定電極上に配置されたメディエータが溶解し、電極反応の結果、その信号が取り込まれる極めて短時間(通例0~数秒)の間に、試料中の目的物質と酵素等生理活性物質との反応の結果生じたメディエータが測定電極へ拡散により到達しないような位置関係であればよい。

【0022】メディエータを利用しない、過酸化水素電極などを利用したバイオセンサーでは、測定電極上には何ら配置しない。ただし、親水性高分子等は試料導入の円滑化を図るため配置してもよい。一方、酵素等の生理活性物質は測定電極から十分離れた位置に配置する。その位置は試料供給後、試料中の妨害物質が直接的に電極反応の結果、その信号が取り込まれる極めて短時間(通例0~数秒)の間に試料中の目的物質と酵素等生理活性物質との反応の結果生じた過酸化水素等が測定電極へ拡散により到達しないような位置関係であればよい。

【0023】さらに、測定電極と離れた部位の配置部から拡散したメディエータ、過酸化水素などの測定電極への到達時間を適度に調節(延長)するため、配置する酵素への親水性高分子添加量を増加することができる。あるいは、配置した酵素層を覆う形で、親水性高分子層を形成することができる。

【0024】本発明の分離定量方法では、バイオセンサーに試料供給当初(通例数秒以内)に第1の電流測定を行い、試料供給後十分な時間経過後(通例数10秒以内)に、第2の電流測定を行なう。第1の電流測定値は、酵素等の生理活性物質と反応した目的物質からの生成物が測定電極に到達する以前の値であり、これから試料中に共存する妨害物質濃度が定量できる。第2の電流測定値は、妨害物質および酵素等の生理活性物質と反応した目的物質による生成物両者による値であり、これから、目的物質および妨害物質の和の濃度が定量できる。従って、第1の電流測定値から得られた妨害物質の濃度を第2の電流測定値から得られた濃度値より差し引くことにより目的物質の濃度を求めることができる。なお、第1および第2の電流測定のタイミングは、各々妨害物質および目的物質と妨害物質両者に起因する電流を正確に測定できるタイミングであることが重要であり、上記通例の時間に拘束されるものではない。

#### 【0025】実施例1

作製した2電極式分離分析用バイオセンサーの模式断面図を図1に示す。ポリエチレンテレフタレート(PET)製シート状基板1上に、シルク印刷により銀リード線付カーボン電極2を形成した。その上に、被検液を収容する空間3'を有するPET製スペーサ3を両面接着テープにより貼付した。さらにスペーサ3の電極2と反対側にも両面接着テープにより蓋4を貼付した。被検液を開口7より空間3'内へ導入することにより測定が行なわれる。次の(A)、(B)及び(C)の手順で配置した。

【0026】(A)電極2の一定面積を占めるカーボン電極上5の位置に、3.3mMのフェリシアン化カリ(30 $\mu$ l)を滴下し、乾燥することにより、電極上にフェリシアン化カリを固相として配置した。

(B)蓋4の内面上6の位置に、160mMフェリシアン化カリ及び400U/ml乳酸酸化酵素を含むpH6.4の0.1Mクエン酸緩衝液5 $\mu$ lを滴下し、乾燥することにより酵素およびフェリシアン化カリを固相として配置した。

(C)電極2の5の位置に、3.3mMフェリシアン化カリ(30 $\mu$ l)を滴下し、乾燥することにより、電極上にフェリシアン化カリを固相として配置し、さらに蓋4の内面上6の位置に160mMフェリシアン化カリ及び400U/ml乳酸酸化酵素を含むpH6.4の0.1Mクエン酸緩衝液5 $\mu$ lを滴下し、乾燥することにより酵素およびフェリシアン化カリを固相として配置した。

#### 【0027】実施例2

実施例1(A)で作製したセンサーに、2mMアスコルビン酸水溶液、10 $\mu$ lを開口部7より導入すると同時に、検知電極-対極間に一定電位+200mVを印加し、陽極酸化電流を測定した。結果を図2(線A)に示す。陽極電流は、電位+200mV印加で、0.5秒後には最高値に達しており、アスコルビン酸によるフェリ

シアン化カリの還元反応は極めて速く、検出されることがわかった。

### 【0028】実施例3

実施例1(B)で作製したセンサーを用いて、5mM乳酸水溶液10 $\mu$ lを被検試料として、実施例2と同様に陽極電流の時間変化を測定した。結果を図2(線B)に示す。陽極電流は、電位+200mV印加後も4秒間ほとんど0 $\mu$ Aを示し、第1図6の位置で乳酸の酵素反応により生じたフェロシアン化カリの検出電極への到達は約4秒遅延したことがわかった。

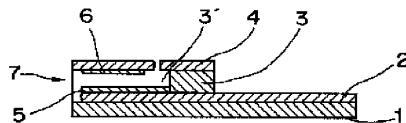
### 【0029】実施例4

実施例1(C)で作製したセンサーを用いて、乳酸濃度0mg/dl、9.0mg/dl、18.0mg/dl、45.0mg/dlに対し、アスコルビン酸0mg/dl、17.6mg/dl、35.2mg/dl(いずれも終濃度)を添加した水溶液を調製し、その10 $\mu$ lを開口部7より導入すると同時に、検知電極-対極間に第一の印加電位+200mVを4秒間印加し、その間、陽極酸化電流を測定した。次に、被検液導入から30秒の酵素反応時間経過後、第二の印加電位+200mVを5秒間印加し、その間陽極酸化電流を測定した。

【0030】測定結果を図3～5に示す。図3はアスコルビン酸濃度0mg/dlにおける乳酸濃度0mg/dl、9.0mg/dl、18.0mg/dl、45.0mg/dlの被検液を測定した場合の時間経過に伴った陽極電極電流の変化である。同様に図4はアスコルビン酸濃度17.6mg/dl、図5はアスコルビン酸濃度、35.2mg/dlにおける乳酸濃度0mg/dl、9.0mg/dl、18.0mg/dl、45.0mg/dlの被検液を測定した場合の陽極電流の変化を示す。

【0031】図6は、図3～5の測定開始より4秒後の応答電流(陽極電流)値を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとったアスコルビン酸に対する検量線である。この検量線は乳酸濃度の幅広い変化にもかかわらず一本の直線で近似することができる。すなわちアスコルビン酸は乳酸から分離定量できた。

【図1】



【0032】図7は、図3～5の測定開始後より35秒後の応答電流(陽極電流)値を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとった乳酸に対する検量線である。この検量線はアスコルビン酸の各濃度に対し、それに依存した応答電流分だけ、縦軸正方向に移動した。これは、乳酸測定に対してアスコルビン酸の正の妨害があることを示している。図7の検量線を図6のアスコルビン酸の検量線を使って補正した。すなわち、第1の印加電位時と第2の印加電位時のアスコルビン酸に対する応答電流の感度差を考慮し、図7のアスコルビン酸0mg/dlおよび35.2mg/dlに対する検量線が原点を通るよう図6のアスコルビン酸の検量線を修正した後、その検量線(直線)を使って図7のすべての測定点を補正した。結果を図8に示す。この検量線はアスコルビン酸の幅広い変化にもかかわらず一本の直線で近似することができた。すなわち乳酸はアスコルビン酸から分離できた。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の2電極式分離分析用バイオセンサーの1例の模式断面図。

【図2】 実施例2および3において得られた陽極酸化電流の測定値を示すグラフ。

【図3】 アスコルビン酸濃度0mg/mlにおける各種乳酸濃度での陽極酸化電流の変化を示すグラフ。

【図4】 アスコルビン酸濃度17.6mg/mlにおける各種乳酸濃度での陽極酸化電流の変化を示すグラフ。

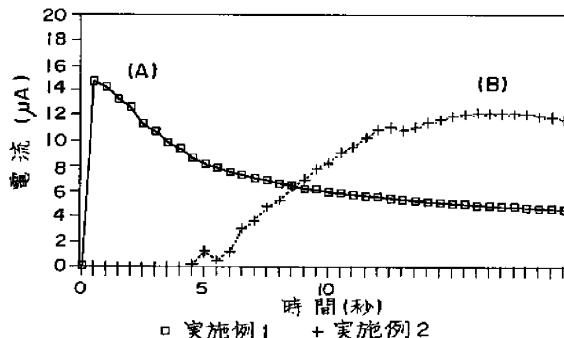
【図5】 アスコルビン酸濃度35.2mg/mlにおける各種乳酸濃度での陽極酸化電流の変化を示すグラフ。

【図6】 図3～5の測定開始より4秒後の応答電流(陽極電流)値を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとったアスコルビン酸に対する検量線。

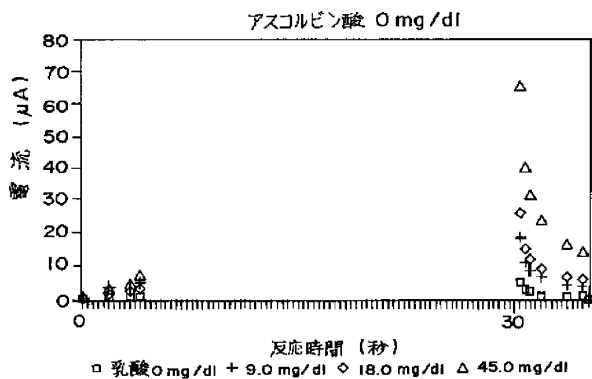
【図7】 図3～5の測定開始後より35秒後の応答電流(陽極電流)値を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとった乳酸に対する検量線。

【図8】 図7の検量線を図6のアスコルビン酸の検量線を使って補正した検量線。

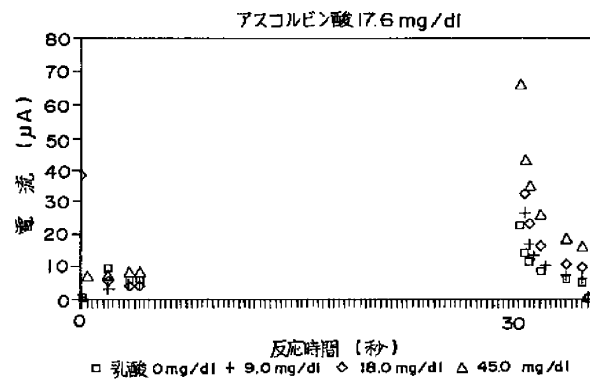
【図2】



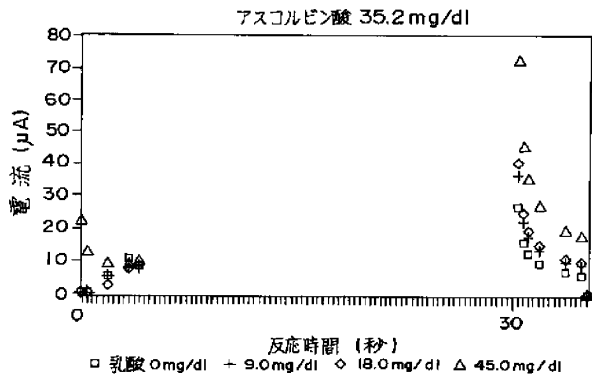
【図3】



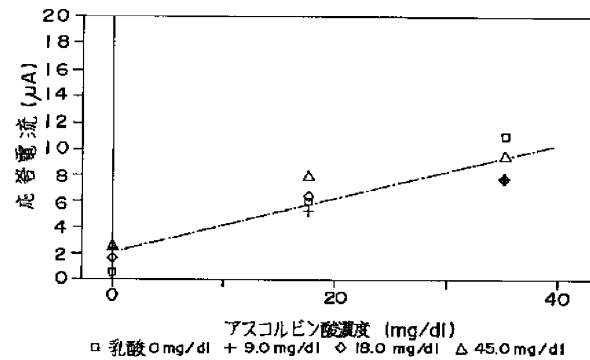
【図4】



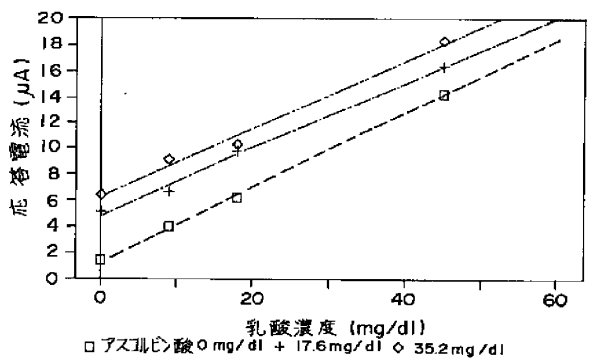
【図5】



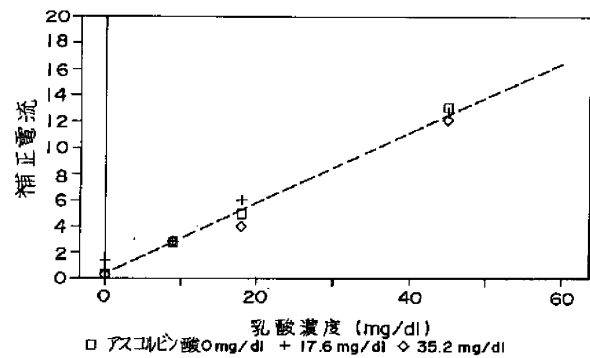
【図6】



【図7】



【図8】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年4月27日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項4】 配置した生理活性物質またはそれに関与する物質、あるいは少なくともメディエータが共存配置された生理活性物質またはそれに関与する物質と液体試料が接する部位を高分子物質層で被覆した請求項1～3のいずれかに記載のバイオセンサー。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】さらに、測定電極と離れた部位の配置部から拡散したメディエータ、過酸化水素などの測定電極への到達時間を適度に調節(延長)するため、配置する酵素層への親水性高分子添加量を増加することができる。あるいは、配置した酵素層を覆う形で、親水性高分子層を形成することができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】(A)電極2の一定面積を占めるカーボン電極上5の位置に、3.3mMのフェリシアン化カリ(30 $\mu$ l)を滴下し、乾燥することにより、電極上にフェリシアン化カリを固相として配置した。

(B)蓋4の内面上6の位置に、160mMフェリシアン化カリ及び400U/ml乳酸酸化酵素を含むpH6.4の0.1Mクエン酸緩衝液5 $\mu$ lを滴下し、乾燥することにより酵素およびフェリシアン化カリを固相として配置した。

(C)電極2の5の位置に、3.3mMフェリシアン化カリ(30 $\mu$ l)を滴下し、乾燥することにより、電極上にフェリシアン化カリを固相として配置し、さらに蓋4の内面上6の位置に160mMフェリシアン化カリ及び400U/ml乳酸酸化酵素を含むpH6.4の0.1Mクエン酸緩衝液5 $\mu$ lを滴下し、乾燥することにより、酵素およびフェリシアン化カリを固相として配置した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】図7は、図3～5の測定開始後より35秒後の応答電流(陽極電流)値を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとった乳酸に対する検量線である。この検量線はアスコルビン酸の各濃度に対し、それに依存した応答電流分だけ、縦軸正方向に移動した。これは、乳酸測定に対してアスコルビン酸の正の妨害があることを示している。図7の検量線を図6のアスコルビン酸の検量線を使って補正した。すなわち、第1の電位印加時と第2の電位印加時のアスコルビン酸に対する応答電流の感度差を考慮し、図7のアスコルビン酸0mg/dlおよび35.2mg/dlに対する検量線が原点を通るよう図6のアスコルビン酸の検量線を修正した後、その検量線(直線)を使って図7のすべての測定点を補正した。結果を図8に示す。この検量線はアスコルビン酸の幅広い変化にもかかわらず一本の直線で近似することができた。すなわち乳酸はアスコルビン酸から分離できた。

【手続補正5】

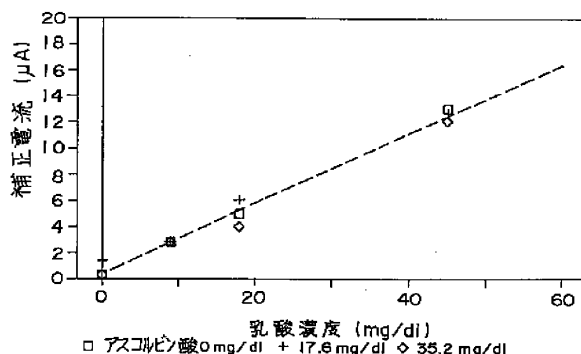
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

6923-2 J

27/46

3 3 6 B